

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：87401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2011

課題番号：19700334

研究課題名（和文）メチル水銀による錐体外路障害メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of the extrapyramidal symptoms caused by methylmercury chloride

研究代表者

丸本 倍美 (MARUMOTO MASUMI)

国立水俣病総合研究センター・基礎研究部・主任研究員

研究者番号：00335506

研究成果の概要（和文）：

水俣病の症状が重度であり錐体外路症状が臨床的に認められている症例のなかには、錐体外路諸核およびその経路にも病理学的傷害が認められる症例が存在することがわかった。また、病理学的に脳全域が広範にわたり重度に傷害されている症例においては錐体外路諸核にも病変が認められることがわかった。マウスにメチル水銀を投与すると行動学的に自発運動量が増加し、病理学的には線条体にアストログリアの増殖を伴う神経細胞壊死が認められることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

The patients who had severe symptom of Minamata disease and, in the case that an extrapyramidal sign was observed clinically, showed pathological changes in the extrapyramidal tract nuclei. In addition, pathological changes were observed in the extrapyramidal tract nuclei in the case that whole brain was damaged severely. The methylmercury treated mice displayed locomotor hyperactivity. Histopathological examination showed significant decrease in the number of neurons with proliferation of astroglia in the bilateral caudate putamen in the methylmercury treated mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,100,000	0	1,100,000
2009年度	0	0	0
2010年度	189,785	0	189,785
2011年度	910,215	0	910,215
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：メチル水銀・水俣病・マウス・線条体・小型神経細胞・錐体外路

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は様々な魚類に含まれ、主として中枢神経系に傷害を与える重金属である。四方を海に囲まれ、魚類を多食する日本人にとって、メチル水銀に関する諸問題は注目度が高い。本邦は水俣病を経験した国であるこ

とから、メチル水銀汚染問題は過去の問題ではなく、現在においても市民に感心の高い問題となっている。

水俣病はメチル水銀に汚染された魚介類を摂取することにより発生した。水俣病の主な臨床症状は四肢末端の感覚障害、運動失調、

視野狭窄、歩行障害等である。病理学的には大脳の視覚野、運動野、小脳皮質および感覚性末梢神経を中心に病変が見られる。

水俣病は発生当時、錐体外路症状を主徴とする原因不明の中樞疾患として捉えられており、中毒原因物質としてマンガンを疑われていたこともある。実際に、剖検例の中には大脳基底核に病変が認められた症例もあった。また、生存している水俣病患者の中には、不随意運動、運動調整障害などの錐体外路症状が認められる。しかしながら、錐体外路症状を惹起する病変については未だ明らかになっていない点が多い。

メチル水銀を用いた曝露実験は様々な動物種において行われている。特にラットを用いた実験が多く、末梢神経および小脳に病変が形成されることが知られている。しかし、メチル水銀を曝露された実験動物では、これまでに線条体障害を主徴とする動物モデルはなかった。申請者らのこれまでの研究により、マウスにメチル水銀を投与すると行動学的に自発運動量が増加し、病理学的には線条体にアストログリアの増殖を伴う神経細胞壊死が認められることが分かった。ヒトメチル水銀中毒患者において、病理組織学的に大脳皮質の第2層および第4層、小脳顆粒細胞を主とした小型神経細胞が傷害されやすいことが知られている。マウスの線条体には多くの小型神経細胞が存在することから、マウスモデルを利用することにより、小型神経細胞傷害メカニズムに新たな知見を加えることも期待される。

2. 研究の目的

(1) これまでに剖検された胎児性、小児性および成人性の水俣病患者の錐体外路系諸核およびその経路を中心として病理学的に再検索を行い、錐体外路症状を惹起した病変を明らかにすること。

(2) メチル水銀を用いた曝露実験は様々な動物種において行われている。特にラットを用いた実験が多く、末梢神経および小脳に病変が形成されることが知られている。しかし、マウスにメチル水銀を投与した場合の病変形成については未だ不明な点が多い。研究代表者らのこれまでの研究により、マウスにメチル水銀を投与すると行動学的に自発運動量が増加し、病理学的には線条体にアストログリアの増殖を伴う神経細胞壊死が認められることが分かった。そこで、線条体の傷害程度を病理学的により詳細に検索し、マウスに認められた行動学的異常との関連性を検討する。曝露期間および濃度により生じる病理変化および臨床症状の差異も合わせて明らかにすること。

(3) メチル水銀を長期間・低濃度投与することにより惹起される中枢神経系への影響を病理学的および行動学的に検討すること。

(4) 高濃度短期間水銀曝露実験および低濃度長期間水銀曝露実験において未実施である Autometallography 法を実施し、これまで得られたデータに水銀の病理組織標本上の分布を加える。水銀の組織内分布を明らかにすることで、より詳細な病理学的知見を得ること。

3. 研究の方法

(1) 胎児性、小児性および成人性、それぞれにおいて錐体外路諸核およびその経路の傷害程度を病理学的に検索し、合わせてカルテに記載されている臨床症状との関連性を検討。

(2) 高濃度短期間メチル水銀曝露実験：線条体の傷害程度を病理学的に検索し、マウスに認められた行動学的異常との関連性を検討する。また、曝露期間および濃度により生じる病理変化および臨床症状の差異も合わせて明らかにする。

検索材料：マウス

検索方法：病理組織学的検索；HE 染色、免疫染色 (GFAP、NeuN、チロシン水酸化酵素等)、Autometallography 法

行動学的検索；Open field apparatus、Elevated plus maze

水銀濃度測定；還元気化原子吸光法

(3) 低濃度長期間メチル水銀曝露実験：主として中枢神経系への影響を病理学的に検索するが、合わせて中枢神経系以外の他臓器における病理学的検索も実施する。また、低濃度長期間曝露による行動学的な影響も検討する。

検索材料：マウス

検索方法：病理組織学的検索；HE 染色、免疫染色 (GFAP、NeuN、チロシン水酸化酵素等)、Autometallography 法

行動学的検索；Open field apparatus、Elevated plus maze

水銀濃度測定；還元気化原子吸光法

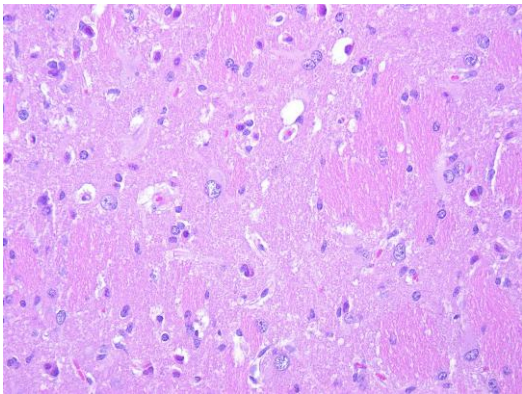
(4) 高濃度短期間メチル水銀または低濃度長期間メチル水銀曝露されたマウスにおける臓器内の水銀の局在を、水銀を可視化させる手法である Autometallography 法を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 胎児性、小児性および成人性それぞれにおいて、いわゆる水俣病の症状が重度であり錐体外路症状がカルテに記載されている

症例のなかには、錐体外路諸核およびその経路にも病変が認められる症例が存在することがわかった。また、病理学的に脳全域が広範にわたり重度に傷害されている症例においては錐体外路諸核にも病変が認められることがわかった。

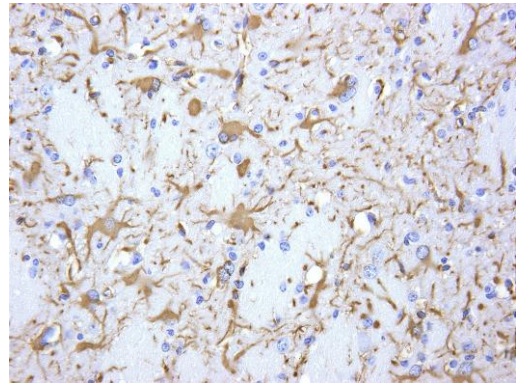
(2) メチル水銀を曝露されたマウスの線条体において主に傷害される細胞は小型神経細胞であり、比較的大型の神経細胞はよく保たれていた。行動学的に自発運動量が大幅に増加する個体においては同時期に線条体障害が強く認められ、自発運動量が軽度増加した個体では線条体傷害が軽度であった。よって、線条体傷害が強くなるのに伴って自発運動量が増加することが示唆された。曝露するメチル水銀濃度を変えることで臨床症状発症までの時期は変わるものの、惹起される病変は変わらなかった。



マウス線条体における小型神経細胞の壊死



マウス線条体における反応性のアストログリアの増殖 (低倍像)



マウス線条体における反応性のアストログリアの増殖 (高倍像)

ヒト・コモンマーモセット・ラットにおいてメチル水銀を曝露された際には小脳の小脳神経細胞が傷害されることがよく知られている。マウスにおいては同様に小脳神経細胞が傷害されるものの、小脳ではなく線条体の小脳神経細胞が傷害されることは興味深く、マウスを用いたメチル水銀曝露実験はメチル水銀による細胞傷害メカニズムの解明に一助となる可能性がある。

(3) マウスにメチル水銀を長期間・低濃度投与することにより惹起される中枢神経系への影響を病理学的および行動学的に検討した。長期間・低濃度投与により行動学的に記憶能の低下が認められた。しかしながら、メチル水銀曝露群において、明らかな海馬神経細胞の傷害および神経細胞数の減少は認められなかった。グリオーシス等も観察されなかった。しかしながら、線条体神経細胞の傷害および神経細胞数の減少が観察され、反応性のアストログリアの増殖が認められた。また、側脳室の軽度の拡張が観察された。軽度ではあるが、大脳皮質の小型神経細胞の減少およびそれに伴う軽度のグリオーシスも観察された。長期間 (約1年間) 曝露することにより、側脳室の軽度の拡張が観察されたのは、線条体小型神経細胞が持続的に傷害され、線条体そのもののボリュームが減少し、側脳室の拡張が惹起されたと推察された。本実験では90%以上の個体が約1年間生存可能な濃度でのメチル水銀曝露を実施した。1ヶ月以内に100%の個体が死亡する高濃度短期間曝露と同様に、病理学的変化は線条体に惹起されることが分かった。

(4) 短期間・高濃度メチル水銀曝露実験および長期間・低濃度メチル水銀曝露実験において未実施である病理組織検索のAutometallography法を実施した。

Autometallography 法は無機水銀を病理組織標本上で可視化することが出来る手法であり、投与されたメチル水銀が脳内で無機水銀へと変化した際の分布を明らかにすることが出来る。短期間・高濃度曝露実験モデルにおいては、曝露期間が短かったため脳内のメチル水銀の無機化の量が少なく可視化されたのは線条体のアストログリアなどわずかであった。長期間・低濃度曝露実験モデルにおいては大脳小脳など脳内全域の神経細胞・ミクログリア・アストログリアに軽度に瀰漫性に分布していた。脳内において無機化された無機水銀は脳内に広く分布しており、病変部位との関連は認められなかった。今後は脳内におけるメチル水銀の分布を可視化できる手法を開発し研究を推進したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

① Sawada M, Fujimura M, Yasutake A. Methylmercury exposure induces hyperactivity and neuronal loss in the caudate putamen in mice. Twenty-fourth international neurotoxicology conference. 2007. 11. 14-17, Holiday Inn Riverwalk(San Antonio, Texas, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸本 倍美 (MARUMOTO MASUMI)

国立水俣病総合研究センター・基礎研究部・主任研究員

研究者番号：00335506

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：